



## PATENTVERKET

(44) Ansökan utlagd och utläggningsskriften publicerad 89-10-02

(41) Ansökan allmänt tillgänglig 83-02-28

(22) Patentansökan inkom 82-08-25

(24) Löpdag 82-08-25

(62) Stamansökans nummer

(86) Internationell ingivningsdag

(86) Ingivningsdag för ansökan om europeiskt patent

(30) Prioritetsuppgifter

81-08-27 US 296715

(21) Patentansökningsnummer 8204873-7

Ansökan inkommen som:

- ☒ svensk patentansökan  
☐ fullföljd internationell patentansökan med nummer  
☐ omvandlad europeisk patentansökan med nummer

(71) SÖKANDE Eli Lilly and Company Indianapolis Ind US

(72) UPPFINNARE 1) R E Chance, 2) B H Frank, 3) J A Galloway, 1) Westfield, 2, 3) Indianapolis Ind

(74) OMBUD Delmar J-Å

(54) BENÄMNING Farmaceutiska preparat, innefattande humant insulin och human C-peptid

(56) ANFÖRDA PUBLIKATIONER: DE A 2 460 753

ANDRA PUBLIKATIONER: New England Journal of Medicine, vol 295, Nr 4 1976, D.L. Horwitz et al, "Circulating serum C-peptide", p 207-209  
Diabetes, vol 27, suppl. 1, 1978, N. Yanaihara et al, "Synthesis of C-peptides and human proinsulin", p 149-160.  
E. Sandell "Galenisk farmaci", andra uppl. 1967, Boktryckeri AB Thule, Sth, p 206-207.

(57) SAMMANDRAG:

Uppfinningen avser en farmaceutisk komposition, som tillsammans med en farmaceutiskt acceptabel bärare innefattar humant insulin och human C-peptid i ett molförhållande humant insulin : human C-peptid som ligger i intervallet från ca 1:4 till ca 4:1. Kompositionen är värdefull för behandling av diabetes samt för befrämjande av naturlig hormon-homeostas, varigenom kompositionen motverkar uppkomst av sådana sjukdomssymptom eller tillstånd, som utgör komplikationer av diabetes.

Diabetes mellitus är en ämnesomsättningssjukdom, vid vilken kroppsvävnaderna icke förmår oxidera kolhydrater i normal utsträckning. Den viktigaste sjukdomsfaktorn är bristen på insulin. Under de senaste 60 åren har diabetessjuka personer i stor utsträckning kunnat få hjälp genom att de givits insulin i kontrollerade mängder. Hittills har det insulin, som använts av diabetikerna, isolerats ur bukspottkörtlar från djur, i regel nötkreatur och svin. Både nötkreatursinsulinet och svininsulinet skiljer sig från det av människans bukspottkörtel alstrade insulinet i fråga om sin struktur. Sedan en kort tid tillbaka har det tack vare rekombinant-DNA-tekniken blivit möjligt att framställa ett insulin, som är identiskt med det av människans bukspottkörtel tillverkade insulinet. Genom att använda ett sådant insulin kan diabetespatienten mera troget än hittills efterlikna kroppens naturliga system.

Man vet emellertid sedan lång tid tillbaka att insulinadministration ensam icke är tillfyllest för att hos diabetespatienten återställa och/eller upprätthålla en normal ämnesomsättning. Insulin har visserligen sin påtagliga effekt på kolhydratmetabolismen, men det finns ytterligare sjukliga företeelser som uppkommer i samband med diabetes mellitus; de flesta av dessa (om icke alla) har att göra med blodkärlens struktur och funktion. Endast sällan är det med konventionell insulinterapi möjligt att fullständigt korrigera de defekter, som leder till nämnda sjukliga företeelser.

De med diabetes förknippade abnormiteterna i kärlsystemet kallas ofta "komplikationer av diabetes". De består vanligen i mikroangiopatiska förändringar, som ger upphov till skador i näthinnan och njurarna. Ytterligare en komplikation av diabetes är neuropati, som eventuellt kan tänkas ha direkt eller indirekt samband med nyssnämnda mikroangiopatiska förändringar. Exempel på specifika manifestationer av diabeteskomplikationer är 1) ögonsjukdomar, bl.a. retinopati, grå starr, grön starr (glaukom), förlamning av extraokulära muskler; 2) munsjukdomar, bl.a. gingivit, ökad kariesfrekvens, periodontala sjukdomstillstånd, större resorption av alveolarben; 3) motorisk, sensorisk och autonom neuropati; 4) sjukliga tillstånd i de stora kärlen; 5) mikroangiopati; 6) hudsjukdomar, bl.a. xanthoma diabeticorum, necrobiosis lipoidica diabeticorum, furunkulos, mykos och pruritus; 7) njursjukdomar, bl.a. diabetes-glomeruloskleros, arteriolär nefroskleros, pyelonefrit; och 8) problem i samband med havandeskap, bl.a. hos de nyfödda

barnen ökad frekvens av hög födelsevikt, dödfödda barn, missfall, neonatal död och medfödda defekter hos barnen.

Många och kanske alla komplikationerna av diabetes uppkommer på grund av att insulinet ensamt i sig självt icke förmår återställa den naturliga hormonbalansen i kroppen.

Föreliggande uppfinning avser farmaceutiska kompositioner, som bättre än insulin administrerat ensamt för sig självt förmår åstadkomma och upprätthålla naturlig hormonhomeostas hos en diabetespatient.

Uppfinningen avser således en farmaceutisk komposition, vilken tillsammans med en farmaceutiskt acceptabel bärare omfattar humant insulin och human C-peptid i ett molförhållande humant insulin : human C-peptid inom intervallet från ca 1:4 till ca 4:1.

De båda viktiga beståndsdelarna av de farmaceutiska kompositioner, som avses enligt föreliggande uppfinning, är humant insulin och human C-peptid.

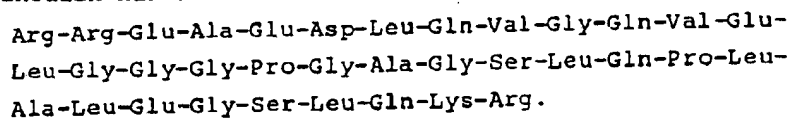
Humant insulin kan erhållas på olika sätt, bl.a. genom organiska synteser, isolering ur humana bukspottkörtlar, omvandling av humant proinsulin, omvandling av isolerat animaliskt insulin samt - sedan någon tid tillbaka - genom rekombinant-DNA-teknik.

Med användning av rekombinant-DNA-teknik kan humant insulin framställas genom separat expression och isolering av å ena sidan A-kedjan i humant insulin och å andra sidan B-kedjan i humant insulin, med efterföljande upprättande av deras speciella disulfidbryggor. Alternativt kan den medelst rekombinant-DNA-tekniken bildade produkten vara själva det humana proinsulinet som sådant eller en prekursor till humant proinsulin, vilken sedan omvandlas till humant proinsulin. Därefter spjälkas proinsulinet enzymatiskt, t.ex. med användning av trypsin och karboxipeptidas B, till bildning av humant insulin.

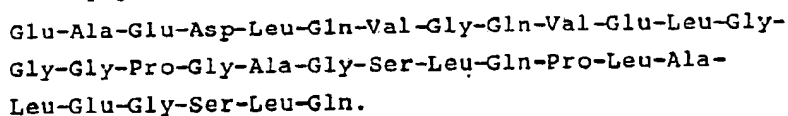
Man kan även framställa humant insulin utgående från insulin från svin. Humant insulin skiljer sig från svin-insulinet med avseende på en enda aminosyra, närmare bestämt i fråga om den aminosyra, som befinner sig vid B-kedjans karboxylände. Alanin, som är B-30 aminosyran i svin-insulin, avspjälkas och ersättes med treonin. Se härtill exempelvis U.S.-patentet 3.276.961.

Den andra aktiva beståndsdelen i den enligt uppfinningen avsedda kompositionen, nämligen den humana C-peptiden, är en del av en peptid som ingår i humant proinsulin och till vilken insulinets

A- och B-kedjor är knutna. Denna peptid, som kallas "förbindelsepeptid" (connecting peptide), avlägsnas i samband med att humant insulin framställs ur proinsulin. Förbindelsepeptiden i humant proinsulin har formeln



Den humana C-peptid, som ingår i kompositionen enligt föreliggande uppfinning, skiljer sig från förbindelsepeptiden genom att fyra aminosyror är eliminerade, två vid vardera änden. Den humana C-peptiden har sålunda följande struktur:



Den humana C-peptiden, som ingår i kompositionen enligt uppfinningen, kan framställas genom kemisk syntes; se t.ex. N. Yanaihara, C. Yanaihara, M. Sakagami, N. Sakura, T. Hashimoto och T. Nishida i Diabetes 27 (suppl. 1), 149-160 (1978). Den kan även framställas ur humant proinsulin, varvid den erhålles till följd av att den avspjälkas vid framställning av humant insulin.

De aktiva beståndsdelarna i kompositionen enligt uppfinningen kan således erhållas på flera olika sätt, såsom ovan visats, bl. a. ur humant proinsulin. Framställning av insulin medelst rekombinant-DNA-teknik kan i generella ordalag sägas innebära följande: Man iordningställer eller bereder en DNA-sekvens, som kodar för human-proinsulinets aminosyrasekvens, varvid nämnda DNA-sekvens kan erhållas genom isolering, konstruktion eller en kombination av båda dessa tillvägagångssätt. Den för humant proinsulin kodande DNA insättes sedan i läsfas i en lämplig klonings- och expressionsbärare. Bäraren användes för transformering av en lämplig mikroorganism, varefter den transformerade mikroorganismen underkastas sådana jäsningsbetingelser som resulterar i a) bildande av ytterligare exemplar (kopior) av den proinsulin-genen innehållande bäraren och b) expression (dvs. bildande) av proinsulin eller en proinsulinprekursor.

Om nämnda expressionsprodukt enligt b) är en proinsulinprekursor, innefattar den i regel det humana proinsulinets aminosyrasekvens bunden vid sin aminogruppände till ett fragment av ett pro-

tein, vars expression eller bildning normalt är kodad inom den gen-sekvens, i vilken proinsulin-genen har insatts. Proinsulinets ami-nosyrasekvens är förbunden med ifrågavarande proteinfragment genom ett specifikt spjälkbart förbindningsställe, i typiska fall metionin. Denna produkt kallas ofta "fused gene product", (dvs. produkt från s.a.s. inbördes "hopsmälta" gener), i det följande förkortat "f.g.-produkt".

Proinsulin-aminosyrasekvensen avspjälkas från f.g.-produkten med användning av cyanogenbromid, varefter proinsulin-aminosyra-sekvensens cysteinsulphydrylgrupper stabiliseras genom att de över-föres till motsvarande S-sulfonater.

Det erhållna proinsulin-S-sulfonatet renas, och det renade proinsulin-S-sulfonatet omvandlas sedan till proinsulin genom upp-rättande av de tre disulfidbryggorna på deras rätta ställen.

När proinsulinet har renats spjälkas detsamma enzymatiskt. I typiska fall använder man härvid trypsin och karboxipeptidas B. Man erhåller då humant insulin och human C-peptid.

Kompositionerna enligt föreliggande uppfinning innehåller humant insulin och human C-peptid i ett molförhållande inom området från ca 1:4 till ca 4:1. Företrädesvis ligger förhållandet humant insulin : human C-peptid i intervallet från ca 1:2 till ca 2:1, allra helst från ca 1:1 till ca 2:1.

Såsom ovan angivits är kompositionerna enligt uppfinningen värdefulla för befrämjande av naturlig hormonhomeostas och därigenom för förhindrande eller avsevärd minskning eller fördröjning av de fenomen, som befunnits vara komplikationer av diabetes. Beträffande den mängd av kompositionerna enligt uppfinningen, som behövs anting-en för upprätthållande av naturlig hormonhomeostas eller för upp-nående av ett sådant tillstånd hos diabetikern, vilket ligger närmare det naturliga hormonhomeostastillståndet, så gäller givetvis att denna mängd kommer att bli beroende av diabetessjukdomens svårhets-grad. Dessutom varierar mängden av kompositionen i beroende av administreringsättet. Det blir i sista hand den enskilde läkaren, som får avgöra i hur stor mängd och hur ofta kompositionen skall ad-ministreras. Dock kan sägas att doseringen i allmänhet kommer att ligga i det intervall, som ger från ca 0,02 till ca 5 enheter humant insulin per kg kroppsvikt per dygn, företrädesvis från ca 0,1 till ca 1 enhet humant insulin per kg kroppsvikt per dygn.

Kompositionen administreras parenteralt, inkl. subkutana, intramuskulära och intravenösa administreringar. Kompositionerna enligt uppfinningen omfattar de aktiva beståndsdelarna, dvs. humant insulin och human C-peptid, tillsammans med en farmaceutiskt acceptabel bärare för dem samt eventuellt andra terapeutiska beståndsdelar. Den totala mängden aktiva beståndsdelar i kompositionen ligger i intervallet från ca 99,99 till ca 0,01 viktprocent. Bäraren måste vara acceptabel i den bemärkelsen att den är kompatibel med andra komponenter i kompositionen och icke skadar mottagaren.

Kompositioner enligt uppfinningen, vilka är lämpliga för parenteral administrering, kan lämpligen innefatta sterila vattenlösningar och/eller -suspensioner av de farmaceutiskt aktiva beståndsdelarna, vilka lösningar eller suspensioner företrädesvis göres isotoniska med mottagarens blod; härvid användes vanligen natriumklorid, glycerol, glukos, mannitol, sorbitol och liknande kända medel. Dessutom kan kompositionerna innehålla vilka som helst bland olika valbara adjuvanter, såsom buffertar, konserveringsmedel, dispergeringsmedel, medel som befrämjar en snabbt inträdande verkan, medel som befrämjar långvarig verkan samt andra kända medel. Typiska konserveringsmedel är t.ex. fenol, m-kresol, metyl-p-hydroxi-bensoat m.m. Typiska buffertar är t.ex. natriumfosfat, natriumacetat, natriumcitrat m.m.

Dessutom kan man för pH-inreglering använda en syra, såsom klorvätesyra, eller en bas, såsom natriumhydroxid. I regel ligger den vattenhaltiga kompositionens pH i intervallet från ca 2 till ca 8, företrädesvis i intervallet från ca 6,8 till ca 8,0.

Andra lämpliga tillsatser är exempelvis tvåvärd zinkjon, som vanligtvis ingår - om den ingår - i en mängd från ca 0,01 mg till ca 0,5 mg per 100 enheter humant insulin; samt protaminsalt (t.ex. i form av dess sulfat), som vanligtvis ingår - om det ingår - i en mängd från ca 0,1 mg till ca 2 mg per 100 enheter humant insulin.

Exempel på speciella farmaceutiska kompositioner enligt uppfinningen anges i nedanstående utföringsexempel.

Exempel 1: Preparat med neutralt reguljärt humant insulin:human C-peptid (molförhållande humant insulin : human C-peptid uppgår till 1:4; 40 enheter insulin per ml)

För beredning av 10 ml komposition blandas

humant zinkinsulin (28 enheter/mg)	400 enheter
human C-peptid	30 mg
fenol, destillerad	20 mg
glycerol	160 mg

vatten och antingen 10%-ig klorvätesyra eller 10%-ig natriumhydroxid i tillräckliga mängder för erhållande av en komposition vars volym är 10 ml och vars slutliga pH är 7,0-7,8.

Exempel 2: Preparat med neutralt reguljärt humant insulin:human C-peptid (molförhållande humant insulin : human C-peptid uppgår till 1:1; 100 enheter insulin per ml)

För beredning av 10 ml komposition blandas

humant zinkinsulin (28 enheter/mg)	1000 enheter
human C-peptid	19 mg
fenol, destillerad	20 mg
glycerol	160 mg

vatten och antingen 10%-ig klorvätesyra eller 10%-ig natriumhydroxid i tillräckliga mängder för erhållande av en komposition vars volym är 10 ml och vars slutliga pH är 7,0-7,8.

Exempel 3: Preparat med protamin, zink-humaninsulin : human C-peptid (molförhållande humant insulin : human C-peptid uppgår till 1:1; 40 enheter insulin per ml)

För beredning av 10 ml komposition blandas

humant zinkinsulin (28 enheter/mg)	400 enheter
human C-peptid	8 mg
fenol, destillerad	25 mg
zinkoxid	0,78 mg
glycerol	160 mg
protaminsulfat	4,0-6,0 mg
natriumfosfat, kristaller	38 mg

vatten och antingen 10%-ig klorvätesyra eller 10%-ig natriumhydroxid i tillräckliga mängder för erhållande av en komposition vars volym är 10 ml och vars slutliga pH är 7,1-7,4.

Exempel 4: Preparat med protamin, zink-humaninsulin : human C-peptid (molförhållande humant insulin : human C-peptid uppgår till 2:1; 100 enheter insulin per ml)

För beredning av 10 ml komposition blandas

humant zinkinsulin (28 enheter/mg)	1000 enheter
human C-peptid	9 mg
fenol, destillerad	25 mg
zinkoxid	2,0 mg
glycerol	160 mg
protaminsulfat	10-15 mg
natriumfosfat, kristaller	38 mg

vatten och antingen 10%-ig klorvätesyra eller 10%-ig natriumhydroxid i tillräckliga mängder för erhållande av en komposition vars volym är 10 ml och vars slutliga pH är 7,1-7,4.

Exempel 5: Preparat med isofanprotamin, zink-humaninsulin : human C-peptid (molförhållande humant insulin:human C-peptid uppgår till 1:1; 40 enheter insulin per ml)

För beredning av 10 ml komposition blandas

humant zinkinsulin (28 enheter/mg)	400 enheter
human C-peptid	8 mg
m-kresol, destillerad	16 mg
fenol, destillerad	6,5 mg
glycerol	160 mg
protaminsulfat	1,2-2,4 mg
natriumfosfat, kristaller	38 mg

vatten och antingen 10%-ig klorvätesyra eller 10%-ig natriumhydroxid i tillräckliga mängder för erhållande av en komposition vars volym är 10 ml och vars slutliga pH är 7,1-7,4.

Exempel 6: Preparat med isofanprotamin, zink-humaninsulin : human C-peptid (molförhållande humant insulin : human C-peptid uppgår till 4:1; 100 enheter insulin per ml)

För beredning av 10 ml komposition blandas

humant zinkinsulin (28 enheter/mg)	1000 enheter
human C-peptid	5 mg
m-kresol, destillerad	16 mg
fenol, destillerad	6,5 mg
glycerol	160 mg
protaminsulfat	3,0-6,0 mg
natriumfosfat, kristaller	38 mg

vatten och antingen 10%-ig klorvätesyra eller 10%-ig natriumhydroxid i tillräckliga mängder för erhållande av en komposition vars volym är 10 ml och vars slutliga pH är 7,1-7,4.



Exempel 7: Preparat med zink-humaninsulinsuspension : human C-peptid (molförhållande humant insulin : human C-peptid uppgår till 1:2; 40 enheter insulin per ml)

För beredning av 10 ml komposition blandas

humant zinkinsulin 28 enheter/mg)	400 enheter
human C-peptid	15 mg
natriumacetat, vattenfritt	16 mg
natriumklorid, granulär	70 mg
metyl-p-hydroxibensoat	10 mg
zinkoxid	0,63 mg

vatten och antingen 10%-ig klorvätesyra eller 10%-ig natriumhydroxid i tillräckliga mängder för erhållande av en komposition vars volym är 10 ml och vars slutliga pH är 7,2-7,5.

Exempel 8. Preparat med zink-humaninsulinsuspension : human C-peptid (molförhållande humant insulin : human C-peptid uppgår till 1:1; 100 enheter insulin per ml)

För beredning av 10 ml komposition blandas

humant zinkinsulin (28 enheter/mg)	1000 enheter
human C-peptid	19 mg
natriumacetat, vattenfritt	16 mg
natriumklorid, granulär	70 mg
metyl-p-hydroxibensoat	10 mg
zinkoxid	1,6 mg

vatten och antingen 10%-ig klorvätesyra eller 10%-ig natriumhydroxid i tillräckliga mängder för erhållande av en komposition vars volym är 10 ml och vars slutliga pH är 7,2-7,5.

Exempel 9: Preparat med neutralt reguljärt humant insulin : human C-peptid (molförhållande humant insulin : human C-peptid uppgår till 1:4; 40 enheter insulin per ml)

För beredning av 10 ml komposition blandas

humant natriuminsulin (28 enheter/mg)	400 enheter
human C-peptid	30 mg
fenol, destillerad	20 mg
glycerol	160 mg

vatten och antingen 10%-ig klorvätesyra eller 10%-ig natriumhydroxid i tillräckliga mängder för erhållande av en komposition vars volym är 10 ml och vars slutliga pH är 7,0-7,8.

Exempel 10: Preparat med neutralt reguljärt humant insulin : human C-peptid (molförhållande humant insulin : human C-peptid uppgår till 1:1; 100 enheter insulin per ml)

För beredning av 10 ml komposition blandas

humant natriuminsulin (28 enheter/mg)	1000 enheter
human C-peptid	19 mg
fenol, destillerad	20 mg
glycerol	160 mg

vatten och antingen 10%-ig klorvätesyra eller 10%-ig natriumhydroxid i tillräckliga mängder för erhållande av en komposition vars volym är 10 ml och vars slutliga pH är 7,0-7,8.

#### P a t e n t k r a v

1. Farmaceutisk komposition, k ä n n e t e c k n a d a v att den tillsammans med en farmaceutiskt acceptabel bärare såsom aktiva komponenter innehåller humant insulin och human C-peptid i ett molförhållande humant insulin : human C-peptid från 1:4 till 4:1.
2. Komposition enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a d a v att molförhållandet humant insulin : human C-peptid är från 1:2 till 2:1.
3. Komposition enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a d a v att molförhållandet humant insulin : human C-peptid är från 1:1 till 2:1.
4. Komposition enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a d a v att den innehåller tvåvärd zinkjon.
5. Komposition enligt krav 1, k ä n n e t e c k n a d a v att den innehåller protaminsalt.